

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-509865

第6部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)11月2日

(51)Int.Cl.* G 0 1 N 33/53 33/566	識別記号 T 8310-2 J 8310-2 J	序内整理番号 F I
G 0 6 F 15/40	3 7 0 F 7218-5 L	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 10 頁)

(21)出願番号	特願平4-511681
(86) (22)出願日	平成4年(1992)4月2日
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)10月1日
(86)国際出願番号	PCT/US92/02716
(87)国際公開番号	WO92/17784
(87)国際公開日	平成4年(1992)10月15日
(31)優先権主張番号	678,849
(32)優先日	1991年4月2日
(33)優先権主張国	米国(US)
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, HU, JP, KR, US

(71)出願人	テラビン テクノロジーズ, インコーポレ イテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 サウス サンフランシスコ, ゲイトウェ イ ブールバード 750-エイチ
(72)発明者	コーパー, ローレンス エム. アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 サウス サンフランシスコ, ゲイトウェ イ ブールバード 750-エイチ
(72)発明者	アンブラー, スチュアート エム. アメリカ合衆国 コロラド 80502 ロン ダモント, ピー, オー, ボックス 1705
(74)代理人	弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 SCプロフィールによる被分析物の分類方法

(57)【要約】

存在する可能性のある被分析物の各々が特性パラメータに関して一連の値を与え、特にそのパラメータが特異的結合試薬との交差反応によって生成する場合の、試料中の被分析物組成の確認の精度を、パターン認識の適用で向上した。被検試料を、探査パラメータの各々に関して評価し、所定の濃度の各被分析物に対するパラメータ値のパターンを得た。特異的結合試薬のパネルを使用した場合には、被検試料をこのパネルと反応させ、そして種々の被分析物濃度での親和性を調べた。これにより、各被分析物の既知濃度に対する「SCプロフィール」のデータバンクが得られた。このデータバンクを、コンピュータでアクセス可能な形態で記憶し、次いで未知試料の試験により得たSCプロフィールとこれを比較し得る。

BEST AVAILABLE COP

請求の範囲

1. 交差反応性の被分析物の集合の少なくとも一つのメンバーの被分析物を含有する試料の被分析物組成を調べる方法であって：

該集合のメンバーの特性パラメーターに関するn個の情報チャンネルを含むパネル中のn個の情報チャンネルの各々に関して試料を評価し、特性調査(SC)プロフィールを得る工程；および

該試料から得られた該SCプロフィールを、該交差反応性集合のメンバーの既知の組成から得たSCプロフィールの対照集合と比較する工程；

を包含する方法。

2. 前記評価が、

前記集合のメンバーと反応するn個の特異的結合試薬を含むパネル中の特異的結合試薬の各々と、前記試料とを接触させる工程；および

該パネル中の特異的結合試薬の各々と、該試料との反応性の量を検知および測定し、SCプロフィールを得る工程；

により行われる、請求項1に記載の方法。

3. 前記比較が、

nをパネル中の情報チャンネルの数とするn次元間の情報チャンネルの各々に、前記試料に関して得られた値をプロットすることで得た点を確認する工程；および

7. 前記特異的結合試薬が、抗体、あるいはその免疫学的に反応性のフラグメントであり、そして、該抗体が任意に、一本鎖抗体、あるいは組換えで製造された抗体である、請求項2から6に記載の方法。

8. 前記交差反応性の被分析物の集合が、トリアジン類を包含する、請求項1から7に記載の方法。

9. 交差反応性の被分析物の集合のメンバーに関する特性パラメーターに各々関連した情報チャンネルのパネルに関するSCプロフィールの参照集合を準備する方法であって：

一連の濃度の該メンバーで、該交差反応性の被分析物の集合のメンバーの各々に関する該パネルの各情報チャンネル中の特性パラメーターの各々の値を調べ、上記の濃度の各々で、該パネルに対する該メンバーのSCプロフィールを得る工程；および

該SCプロフィールを、コンピュータでアクセス可能な形態で記憶する工程；

を包含する方法。

10. 前記コンピューターでアクセス可能な形態が、交差反応性の被分析物の集合の少なくとも1つのメンバーの被分析物を含む試料の被分析物組成を調べるために有用な、n次元空間中の点のパターンであり、該点のパターンが、

各濃度の被分析物に関する特性パラメーターの値を、n次元空間中のn個の各特性パラメータに対してプロットして得られる点を固定する工程；および

該点の位置と、前記パネルと反応させた前記被分析物メンバーの種々の濃度を表す該n次元の空間中の予め決められた点とを比較し、それにより該試料の被分析物組成を調べる工程；

を包含する、請求項1あるいは2に記載の方法。

4. 前記比較が、

前記パネル中の各特性パラメーターの値に対応する前記試料中の各候補被分析物の濃度の値を調べ、各候補被分析物に関するn個の調べられた濃度の組を得る工程；および

該パネルの該n個の特性パラメーターの中から最も適切な濃度をもたらすものとして該被分析物を同定する工程；

を包含し、

最適にはさらに、特性パラメータの各々に関する試験結果に重み付を行う工程；

を包含する、請求項1から3に記載の方法。

5. 前記比較が、各SCプロフィール中の各特性パラメーターに関する結果を、SCプロフィールの対照セットを含有するニューラルネットに提供する工程を含有する、請求項1から3に記載の方法。

6. 前記交差反応性の被分析物の集合が、2-20個のメンバーを含有する、および/あるいは

前記特性パラメーターのパネルが、2-10個の特性パラメーターを含有する、

請求項1から5に記載の方法。

n次元空間中に、既知の被分析物濃度を表す、該点のパターンを得る工程；、

で得られる、請求項9に記載の方法。

11. 前記パターンをより低次元の空間に投影し、コンピュータでより扱い易い前記既知の濃度の表現形式を得る工程をさらに包含する、請求項10に記載の方法。

12. 前記特性パラメーターが、前記交差反応性の被分析物の集合のメンバーに対する特異的結合試薬の反応性を包含し、そして、前記各特性パラメーターの値を調べる工程が、メンバーの一連の濃度での、該交差反応性の被分析物の集合のメンバーの各々に関する、前記パネル中の特異的結合試薬の各々のアフィニティーを調べる工程を包含する、請求項9から11に記載の方法。

13. A) 前記一連の濃度での、前記交差反応性の被分析物の集合のメンバーの各々に関する、前記パネル中の特異的結合試薬の各々のアフィニティーを調べる前記工程が、

異なる既知濃度の該交差反応性の集合のメンバー被分析物を有する複数の試料と、該集合のメンバーと反応性の特異的結合試薬の前記パネル中のn個の特異的結合試薬の各々とを接触させる工程；および

該パネル中の特異的結合試薬の各々と、該既知濃度を含有する試料との反応性の量を検知および測定する工程；

で行われる、そして/あるいは、ここで

B) 該メンバーの一連の濃度での、該交差反応性の被分析

BEST AVAILABLE COPY

物の集合のメンバーの各々に関する、前記パネル中の特異的結合試薬の各々のアフィニティーを調べる前記工程が：

各濃度での、該アフィニティーの値を、該前記被分析物の該パネルのメンバーに対する阻害曲線から、計算する工程；
で行われる、請求項1-2に記載の方法。

1-4. 前記特異的結合試薬が、抗体、あるいはその免疫学的に反応性のフラグメントであり、そして、該抗体が任意に、一本鎖抗体、あるいは組換えで製造された抗体である、請求項1-2から1-3に記載の方法。

1-5. 前記交差反応性の被分析物の集合が、トリアジン類である、請求項9から1-4に記載の方法。

1-6. 請求項9から1-5の方法で得られる、コンピューターでアクセス可能なSDプロファイルの対照セット。

明細書

SDプロファイルによる被分析物の分離方法

技術分野

本発明は、特異的結合試薬に基づくアッセイを用いる未知試料の分析に関する。さらに詳細には、本発明は、未知試料の被分析物組成を調べるために、既知試料と特異的結合試薬のパネルとの反応性によってパターンが調べられる、パターン認識の使用に関する。この方法は、被分析物の種類をも認識し得る。

背景技術

イムノアッセイおよび関連技術は、生物学的試料中の種々被分析物の測定のための標準的手段になってきている。これらの試験の簡略化および正確さの改善のために設計された種々のフォーマットが当技術分野で入手し得、そして、この種々のフォーマットが現す数は非常に多い。

これらのアッセイの成功は、特異的な結合試薬を提供する能力に依存している。結合試薬は通常、抗体あるいは抗体のフラグメントであり、試料中に存在しうる他の成分に比べ、標的被分析物に対する特異性が高い。例えば、原中のヒト胎毛性ゴナドトロビン(HCG)の検出に依存する妊娠アッセイが多数市場に存在する。これらのアッセイは、使用されるHCGに対

して免疫反応性の抗体が、他の原成分と検出可能な程度に反応しないため、HCGの検出が可能である。

しかしながら、他の特殊な状況では、そのグループの任意の1つに対して調製された抗体に交差反応性のグループのメンバーである被分析物に関して、そして、任意のメンバーあるいは複数のメンバーが同一試料中に存在して得る、試料を分析することが要望されている。この問題の一例は、環境中の殺虫剤および除草剤の調査に関する試みに關している。これらの物質は、構造的に類似している。例えば、van Emon, J.H.ら、In "Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators: Advanced Analytical Techniques," Sherma, J., ed., Academic Press, New York, 1989, pp. 217-263; Vanderkam, M.G., *Environ Sci Technol* (1988) 12:247-254; Newsome, W.H., *J Assoc Offic Anal Chem* (1986) 69:919-923, を参照。

一般には、例えばカルバメート類殺虫剤である特定のクラスの殺虫剤の幾つかのメンバーの内の特定のどれが環境中に存在しているのかは正確には知られていない。加えて、実際に散布された殺虫剤の分解産物もまた、特異的に免疫反応を行うとされる抗体あるいは他の結合試薬と、交差反応を行いう。従って、単純な单一の抗体アッセイだけで、試料の組成の信頼性のある全体像を得ることは不可能である。実際に、この様なアッセイの結果は、例えばそのために抗体が調製された、クラスの同定された特定のメンバーに対する「当量」

の形式でしばしば示される。被分析物の内の1つに対して作成された任意の特異的結合試薬に対する、可能性のある被分析物の交差反応性に加えて、一般的な測定時にはこれらの化合物の濃度範囲は非常に低く、典型的には10-100 nM、あるいはppbの範囲である。この様に低濃度では、より多量に存在する物質との交差反応性の問題が、特に問題である。

上記の交差反応性のために、被分析物濃度の定量的な測定は困難である。例えば、ある抗体の被分析物Bに対する親和性が、被分析物Aに対する親和性の100倍であると假定すると、その抗体を用いた單一の測定法で、50 nMの濃度の被分析物Aを、0.5 nMの濃度の被分析物Bと区別することは不可能である。AとBの種々の混合物もまた、定量的に同様な様式で反応する。従って、單一の抗体を使用する、構造的に類似の種々の被分析物の混合物を含有する試料を試験するための方法はない。

本発明は、重複する特異性を有する反応性試薬との反応の織な場合に、数学的パターン認識技法をパラメータ値に関する情報チャネルのパネルに適用し、これらの困難を克服する。標的的被分析物に関する標準プロファイルの集合が一旦調べられると、試験試料中の被分析物組成のより信頼性の高い測定が可能となり、同時に被分析物の定性の精度が改善される。

発明の開示

存在する可能性のある複数の被分析物が構造的に密接に関

連している試料の被分析物組成の測定を可能とする方法が提供される。これら的方法は、パターン認識技術およびその処理法の利点を利用し、試料組成に関する詳細な情報を与える。

1つの局面では、本発明は、試料の被分析物組成を調べる方法であって、試料と、存在すると考えられている被分析物のクラスのメンバーと幾らか異なる程度の反応性である特異的反応性試薬のパネルの各々とを接触させる工程、を含むする方法を提供する。反応性のプロフィール、即ち「特性検査(SC)プロフィール」が、その試料に関して得られ、そして次に、このSCプロフィールを、標準の既知組成で予め調べられたSCプロフィールとマッチさせる。

別の局面では、本発明は、種々の既知の被分析物組成の予め測定されたSCプロフィールを得る方法であって、予め決められた組成物の集合と、これらの被分析物と反応性の、詳しくはこれらの被分析物と特異的に結合する試薬である2-10が軽ましいn個の試薬のパネルとを接触させる工程、および、各組成物で得られたプロフィールをn次元空間にプロットする工程、を含むする方法に関する。さらに別の局面では、本発明は、この様にして決定された組成パターンに関する。

さらに別の局面では、本発明は、n次元の内のどの次元がアッセイに関して最大の情報量を有するのかを明確にする、従って測定すべき特性(次元)の最小数の選択を可能とする、マルチパラメーター統計解析技法の使用に関する。

この様なグループの他の例には、生物学的な液体あるいは組織中に存在し得る物質のファミリー(生物学的試料の臨床的分析に有用である)が含まれる。一般に、これらのファミリーは3つのカテゴリーに分類される。第一に、ステロイド類、タンパク質ホルモン類、あるいは代謝産物の様な臨床的状態、あるいはそれらの直接投与によって、増大あるいは亢進が減少し得る天然の物質は臨床上有用である。第二に、β-遮断剤類、化学療法剤類、プロスタグラジンインヒビター類等の様な治療目的に設計された人工的物質は、モニターし得る。第三に、種々の不法薬剤のファミリーは、法廷で用いる目的に検出および区別し得る。

目的の生成物の合成に至る一連の反応中の、一連の出発物質および生成物もまた測定し得る(オンラインの品質管理業務に有用である)。この様な測定を目的とする本発明の方法は、これらの物質がファミリーとして合成され、そしてこれらの生成物が同時に製造され、そして分離される生成物を観る場合に特に有用である。代表的な例には、繊維用染料、絶縁物中に用いられるPCB類、および界面活性剤類が含まれる。さらに、全ての製造で、競合する副反応は、構造的に類似し、目的生成物と区別されるべき同じファミリーのメンバーを生成する。

環境中での種々の物質の分解に関する分析値も測定し得る(環境的に重要な物質の存続の評価の場合の如く)。

本発明の方法は、被分析物と、試薬の集合との異なった反

図面の簡単な説明

図1は、一連のモノクローナル抗体の固定されたトリアジンに対する結合の阻害のパターンを、関連抗原の溶液中濃度の関数として示している。

図2は、50 ppbの濃度で調べたトリアジンホモログに関する予測および実験で得た、特性検査(SC)プロフィールを示している。

図3は、10-1000 ppbの濃度範囲の3種のトリアジン系除草剤に関する6次元のSCプロフィールの、量適化した1次元投影図を示している。

発明を実施するための様式

本発明の方法は、特に不純な試料中の、試料中に含まれると考えられる複数の被分析物が比較的密接な関連した構造である被分析物組成の測定の信頼性を改善する。「被分析物組成の測定」という用語により、多くの可能な被分析物の各々の濃度レベルの確認を意味する。被分析物組成の測定に意図が状況には、多くの構造的に関連した物質を類似した目的で使用し得る場合、あるいは、これらの物質が、類似した環境を占有する様な方法で取り扱う場合が含まれる。例えば、多くの除草剤および殺虫剤は、分解産物になった場合互いに他に対してホモログあるいはアナログである。種々のトリアジン誘導体の場合を以下に例示する。これらの誘導体は全て除草剤として有用である。

応性、あるいは被分析物を特徴付ける他のパラメータに依存している。特に、結合試薬が軽ましい。被分析物は構造的に類似なので、かなりの交差反応性が予測され、そして、実際に本発明の方法の必要要件および实用性は、この交差反応性に依存している。便利なパラメータには、典型的にはモノクローナル抗体である抗体の様な結合試薬との反応性があるが、これは単なる例である、必要要件ではない。例えば、その存在、欠如あるいは量を調べるべき被分析物の群と一般的に反応することが判明している任意の物質は、本発明の方法に使用し得る。例えば一本鎖抗体および組換えで製造された抗体を含む抗体は、当技術分野でよく理解されている様に、それ自身、またはその免疫学的反応性のフラグメントとして使用できる。例えばFab、Fab'、あるいはF(ab')₂フラグメントの使用は、特異的結合アッセイでしばしば有用である。酵素-基質結合あるいは酵素-阻害剤結合、リガンド-レセプター結合、あるいは本明細書では参考文献として援用する米国特許第4,963,263号に記載されているパラログの様なアフィニティー試薬への結合の様に、適切な交差反応性を与える任意の試薬相互反応を使用し得る。

特異的な結合による反応性に加え、任意のタイプの反応性を測定し得る。例えば、候補被分析物が一連のアイソエンザイムの場合、パネルの阻害剤の各々の活性に対する影響を測定、あるいは一連の基質に対する活性のレベルを測定し得る。あるいは逆に、被分析物のパネルが一連の関連した基質の場

合、一連の酵素と、これらの関連した基質との反応性を、プロフィールの決定に使用し得る。同じタイプの、反応性あるいは他の特性パラメータを、プロフィールを構成する情報チャネルの各々を調べるために使用する必要はない。従って、プロフィールは、抗体との結合、阻害剤との結合、酵素との反応性、基質との反応性、あるいは測定すべき種々の候補の被分析物に関して変動する値を有する他の化学的活性あるいは物理的特性、の組合せで構成され得る。

同様に、パネル中の試薬の反応性を検出する特異的アッセイのフォーマット、あるいは、被分析物グループのメンバーのプロフィールに関する一連の情報チャネルを与えるパネル中の特性パラメータの値、の選択は任意である。試験される試料の、結合あるいは反応性、そして種々の被分析物組成に対するデータ点の標準セットの作成は、直接法あるいは酵合法のフォーマットの何れでも調べ得る。例えば、結合試薬を標識し、そして得られる複合体を沈降させることで抗原への結合を検知し、そして沈澱中の標識の量を測定し得る。あるいは、より簡便には、結合試薬を固相支持体にキャプリングし、次いで候補被分析物を、既知の結合能力を有する類似の被分析物と競合させる。特定のグループ中の被分析物に対する特異的結合試薬の結合を、既知および測定するために設計されたアッセイを実施するための別の方法は、本明細書では参考文献として援用するPCT出願US88/03554号に開示されている。特異的結合試薬の設計のための方法はまた、全て本明

細書では参考文献として援用する、米国特許第4,963,283号およびPCT US89/01194号とPCT US90/06883号に記載されている。イムノアッセイあるいは他の特異的結合アッセイの実施者は、別のプロトコールも即座に明白となる。

同様に、化学的反応性または物理的特性を測定するためのパラメータを決定する方法もまた、容易に考案し得る。例えば、クロマトグラフィーの支持体中の被分析物の相対吸収度は、分別的な交差反応性を構成し、1つのチャンネルに情報を与える。電気泳動の吸収度、PI値、特定の基質との反応性、または特定の阻害剤による阻害もまたプロフィールに情報を与えるパラメータを構成する。

しかし、各情報チャネルに対する特性パラメータの値が調べられても、「交差反応性」の特性パラメータのパネルに関するプロフィールを、一連の既知の被分析物の組成に関するパネルを、最も単純なこの様な組成物で、標準的なパターンを得るために典型的に使用されるものは、ある範囲の濃度で单一のメンバーの被分析物のみを含む試料である。これらの对照データ点から最終的に得られる標準プロットを用い、既知の位置との相関関係によって、单一被分析物を検出し得る。混合物に対するプロットの位置の計算で、同様のマッチングにより、それらの確認を行い得る。

被分析物、標準物質、および未知組成物に関して調べたプロフィールは、交差反応免疫アッセイ(CRIA)のプロフィールにいくぶん類似しており、そして本発明の方法は、被検試料

のCRIAプロフィールと、既知の被分析物組成の試料から得たCRIAプロフィールの予め調べられたプロットとを比較するのに類似している。本発明の方法では、CRIAプロフィールの概念が拡大され、抗体あるいは結合試薬との反応性のみならず、種々の意味の反応性、および候補被分析物全体にわたる任意の分別的な値を有する物理的あるいは化学的情報特性を含む、特異的反応性の様々な特性パラメータの値の一連のチャンネルを含む。検査し得る特性の数が大きいため、便宜上このプロフィールを、本明細書では特性検査プロフィールまたは「SCプロフィール」と呼ぶ。

従って、「SCプロフィール」という用語は、試薬により得られる情報チャネルのパネルにわたる特性パラメータの値のパターン、あるいは単一の固定された被分析物組成に関する物理的あるいは化学的特性の集合を意味する。本発明に有用な典型的なSCプロフィールでは、2-10個の好みしくは4-6個の異なる情報チャネルに関する被分析物の特性が蓄積される。例えば、2-10個の好みしくは4-6個の異なる試薬のパネルと試料との反応性が調べられる。以下の実施例から明らかな様に、各組成は、試薬との反応性、および/または他の特性で構成されている情報チャネルのパネル全体にわたる特徴的なSCプロフィールを有する。パネルのメンバーの数が多い程、アッセイの改善は大きく、一方パネルのメンバーが少ない程、アッセイはより簡便となる。パネルのメンバーの数の選択は任意であり、アッセイに含まれる数調整のレベルに依存する。

本明細書に開示されている数学的技法は、最も意義のあるパネルのメンバーの選択を可能とし、そしてプロフィールに必要な情報チャネルの数の減少に使用し得る。

しかし、濃度を測定するためにプロフィールを使用する場合は、情報チャネルに利用される特性の少なくとも一つからは、候補被分析物の濃度に従属しなければならない。従って、この様な濃度測定に用いる場合は、レセプター、抗体、または他の特異的結合試薬に対する特異的結合性が特に有用である。しかし濃度依存性の、基質の酵素との反応性、競合インヒビターによる酵素の阻害、およびその他の反応性も使用し得る。

種々の濃度でのプロフィールを得る場合、上記の最も単純な概念的方法を用いて、種々の既知の被分析物の濃度での結合試薬あるいは酵素活性に対する阻害値を直接測定することによってこの一連のプロフィールが得られる。しかしその他のプロフィールは、阻害率(I)対被分析物濃度をプロットして得た曲線を用いて内挿し得る。

数学的処理

未知試料と比較される個々の標準組成に関して得られたプロフィールを、次に標準プロフィールと未知試料のプロフィールとを比較し得るコンピューターを利用した技法で処理する。この方法は用手法では容易に実施し得ない。

これらのパターン認識技法を応用する最も簡単な方法では、

SCプロフィールの各々を、 n を各パネルの結合試薬の数とするn次元中の点としてプロットする。

例えば、モノクローナル抗体である6種の異なる結合試薬を含むパネルが使用し得る。これらの抗体は、例えば、 A_1 を被分析物、 i を1-10の整数とする被分析物 A_i のクラスの10個のメンバーと交差反応性であると仮定する。例えば、これらの被分析物の1つである A_1 を、のそれ自体および残りの被分析物の種々の濃度で結合の競合のプロフィールを調べるために、標準試薬として選択し得る。例えば、一定濃度の標準 A_1 を用い、種々の濃度の A_1-A_{10} で、パネル中の各抗体の結合に関して阻害百分率が調べられる。

1つの濃度の各被分析物 A_i に関して、標準 A_1 がパネル中の種々の抗体への結合を阻害する百分率である6個のデータ点がある。次にこれらの百分率を数学的に処理し、最初の次元が最初の抗体に関する阻害百分率を示し、2番目の次元が2番目の抗体に関する阻害百分率を示す等、6次元的空間中に単一の点の位置が定義される。この様にして、種々の濃度の $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{10}$ を示す点が決定される。

6次元のプロットが容易に視覚化されない場合は、例えばD.L. Massartら、"Chemometrics: A Textbook" (1988) Elsevier, (N.Y.)に記載されている様な公知の数学的方針を用い、その1次元のアレーを2次元の平面あるいは低次元の他の表面に投影し得る。次に、2次元空間中のこの一連の点は、未知の試料を用いて得たプロフィールと標準のプロフィールとの比

較を可視化して試料の組成の同定に利用し得る。当然、6次元空間は数学的に扱い得るので、試料によって生成したデータ点を対照の点のセットのデータ点との比較のために投影を行う必要はない。

しかし、投影を選択すると、SCに対する抗体の有用性に関する抗体をランク順位付けるという別の利点が生じる。6次元的空間中で投影平面が軸線に対して垂直に近い程、投影の際のその要素の情報内容の喪失量が大きくなる。要因分析によって、その情報の分散様式を保持する最適平面が得られるので、この観点からの抗体の相対的重要性は容易に調べ得る。この知見は、例えばパネル中の抗体の数の減少に有効に利用し得る。

以下に記載の実施例では、この比較的簡単な数学的アプローチを用い、信頼性がある推定値が、事例の約85%の未知試料の組成で得られることが見い出された。重要なデータ点を比較的意味のないデータ点と区別するために、種々の方法を適用し、改善された結果が得られた。

効果として、プロフィールを構成する種々のメンバーに対する重み付因子を導入し、標準曲線の直線部分上の結合の阻害を示す濃度が、非常に低いあるいは高い阻害を示す曲線の漸近部分の濃度よりも、情報量が大きいことが明らかにできた。これらの因子は、データを「分散分析」で処理する場合に適用される。この例では一般的な略であるが、この技法では、パネル中の6種のモノクローナル抗体の各々に対応する次

元で表される値は、6種の抗体の全てに対するn次元の結果の全体ではなく、未知試料中の対応する抗体に対応する値と別個に比較される。

例えば、抗体#1の実測阻害値は、被分析物 A_1 の対応する濃度、そして被分析物 A_2 に対する異なる対応する濃度、等を意味する。抗体#2も同様に予想値のファミリーを生成する。等が以下に行われる。被分析物の正しい選択のためには、6種の抗体の個々の予測値は、不正確に選択された被分析物よりもより直接に一致する。プロフィールを確認するこのアプローチは、分散分析の一形態であり、異なった検査室あるいは異なる測定法で得られる独立した推定値の比較に通常は用いられる。分散の計算は、標準曲線の作成に使用したデータ組合の分散で決定されるデータの信頼性を表す因子により予測値に重みを付けるために容易に変更し得る。この方法を本明細書では「結果の重み付け」と呼ぶ。

Hanerl, "The Statistical Analysis of Experimental Data" (1984) Doverに記載されているこの数学的技法は、重要な結合データに充分な重み付けを与える、95%の事例で明確な結果が得られた。

最後に、標準を用い、ニューラルネットの入力/出力特性を訓練する過程で調整因子が必然的に生じるニューラルネットシステムもまた使用し得る。このシステムは、例えばHertz, J.A.ら、"Introduction to the Theory of Neural Computation" (Addison Wesley, Santa Fe Institute Series on Comp

lex Systems, 1991); Parallel Distributed Processing, 2 vols. (D.E. RumelhartおよびJ.L. McClelland編, MIT Press, 1988);あるいは、DARPA Neural Network Study (Armed Forces Communication and Electronics Association Int'l Press, 1988)に概略が記載されている。

化合物に対して中程度の固有特異性のみを有する結合試薬の小さいパネルの使用で達成された被分析物同定のこの高い信頼性は、より高い固有特異性を達成するために膨大な努力を行った従来技術の結合アッセイからは予期し得ない。従って、本発明の方針は、既存のアッセイの信頼性の改善のみでなく、例えば組換えライブラリーからの適切な抗体の単離を容易とする等、イムノアッセイの範囲の拡大にも有用である。

パッケージしたアッセイ

本発明のアッセイに用いる試薬およびソフトウェアは、上記した状況の様な、1つのクラスの種々のメンバーが存在し得る様な状況の複雑な試料の、迅速で簡便なアッセイが可能な様に、簡便にパッケージし得る。結合試薬を用いるこの様なアッセイ用の典型的なキットは、好みしくは固相支持体にカップリングした試薬のパネルのメンバー、および、標識した試薬およびその標識を検出する手段を含む。適切な標識には、放射性同位元素、蛍光発光体および酵素が含まれる。あるいは、抗体の様な結合試薬を、標識した形態で供給し得、および固相支持体にカップリングした結合被分析物。このア

アセイを直接するために、抗体でコートした固相支持体を試料と反応させ、そして次に標識を有する二次抗体で処理するサンドイッチフォーマットを使用し得る。

キットに用いる試薬とアクセサリー物質の選択は、当然、SCプロフィールの標準に用いる特性の選択に依存する。種々の基質に対する反応性、あるいは種々のインヒビターの効果を利用する場合、例えば、キットは候補基質、候補インヒビターおよび反応検出手段を含む。

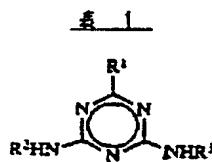
試験パネルと試料との反応で得られた値は、次に、対照のデータバンクと比較される。パッケージされた試薬と共に供給されるソフトウェアは、試料から得た重要な結果の入力および対照パネルとの比較を可能とする。ソフトウェアの種類は、上記の様に、選択した特定の数学的処理に依存する。

下記の実施例は例示を目的とし、本発明の概念を意図したい。

図版A

モノクローナル抗体の製造

Goodrow, M.ら、*J Agric Food Chem* (1990) 38: 980~986に記載されている様に、2種のα-トリアジン化合物のアトラジンおよびシマジン(図版B参照)を、NHSおよびEDCI(Pierce Chemical Company, Rockford, IL)を用いてキーホール・リンベットヘモシアニン(KLH)に結合し、マウスの免疫に用いた。高力価の抗-α-トリアジン抗体が得られた時に、マウスを殺し、



トリアジンアナログ類	R ₁	R ₂	R ₃
1. アトラジン	C1	477'0E'K	E9E
2. シマジン	C1	E9E	E9E
3. プロバジン	C1	477'0E'K	477'0E'K
4. プロメトン	0-E9E	477'0E'K	477'0E'K
5. プロメトリン	S-E9E	477'0E'K	477'0E'K
6. アメトリン	S-E9E	E9E	477'0E'K
7. テルブトリン	S-E9E	t-T'E9E	E9E

カルボジイミド仲介架橋法によるBSAあるいはKLHへの結合のために、アトラジンのR₃のエチル基を-(CH₂)₆COOHで、そしてシマジンのR₁のクロル基を-SC(CH₂)₆COOHで置換した。

一般に、結合は、免疫用およびスクリーニング用に異なった粗体を行った。これにより、スクリーニング時に、目的のハプテンではなく、粗体に対して產生された抗体の検出が最少化される。

実施例1

肺臍細胞を回収した。肺臍細胞とマウスのミエローマ細胞を50%ポリエチレンギリコール中で融合させ、固定したアトラジン・ウシ血清アルブミン(BSA)複合体への結合に関するELISAアッセイを用い、抗体産生をスクリーニングし、ハイブリドーマを得た。これらの複合体は、カルボジイミドを利用したプロトコールで調製した。

陽性の培養物を、限界希釈法でクローニングし、そして安定な細胞株を得た。ウシ胎児血清を含む完全培地の中で培養した。培養上清を集め、分割し、そして-80°Cで凍結保存した。抗体のIgGサブタイプを、Zymed社のアイソタイピングキットを用いて確認した。1種の重要なα-トリアジン誘導体に種々のアフィニティで反応性の5種のモノクローナル抗体からなるパネルを選択した。これらの抗体は、アトラジンによる免疫由来のAM85.3、AM185.1、AM601.2およびAM782.1と、シマジンによる免疫由来のSASAI.1である。

図版B

抗原/被分析物組成物

1種のトリアジン類アナログのセットを用い、本発明の技法を説明する。市販されているこれらアナログの構造を表1に示す。

(以下余白)

抗体の特異性の確認

図版Aの項に記載した様にして得られた5種のモノクローナル抗体を、図版Bの7種の被分析物に対する反応性に関して試験した。このプロフィール化試験は、ELISAフォーマットを用い96-ウェルのマイクトプレート中で行った。このプレートを、4°Cで一晩、アトラジン-BSA複合体でコートした。非特異なタンパク質の結合部位を、各々0.5%のBSAおよびカゼインと共に2時間インキュベートしてブロッカし、次いでPBS-Tween(10 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.2、100 mMのNaClプラス0.05%のTween-20)で洗浄した。緩衝液(PBS/Tweenブレース各々0.1%のBSAとカゼイン)中の、被検抗体プラス種々の濃度の被検α-トリアジンアナログと、4重で(quadruplicate)ウェルに加えた。プレートを室温で2時間インキュベートした。結合した抗体を、二アルカリキヌスファーゼで標識した次亜鉛マウスIgG(1:1000)を用い、p-ニトロフェノールホスフェート(0.1 Mジエチノールアミン、pH 10.3; 0.5 mM MgCl₂中に1 mg/ml)を基質として定量化した。反応生成物の終点吸光度を、405 nmでの吸光度を、Tmaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)で測定し調べた。阻害曲線は、ソフトウェアパッケージSoft Max(V.2.01C, Molecular Devices)中のFour-Parameter Logistic Programを用いフィッティングした。検定の濃度のα-トリアジンアナログの存在による、モノクローナル抗体の固相への結合の減少を、ゼロ投与量の対照の光学濃度の百分率で示した($I/I_0 \times 100\%$)。

アトランジンおよびプロメトリルの代表的試験結果を、各々図1Aおよび1Bに示した。図に示した様に、バネルの阻害曲線は2つのアナログである。5メンバーの抗体バネルに対する1個のアナログ全てに関して、IC50値(50%の阻害物が得られる濃度)を表2に示した。

(以下余白)

これらの結果は、トリアジンアナログの各々が、5メンバーの抗体バネルに対して特徴的プロフィールを有することを示している。

実施例2

SCプロフィールの決定

10-1000 ppbの範囲にわたるトリアジンアナログの各々に関する一連の標準プロフィールを、図1に示した様に、アナログの各々に関して得られた阻害曲線から計算した。50 ppbでのこの理論的計算の結果を図2Aに示した。図から分かる様に、バネル全体の百分率で現した阻害のパターンは、個々の各アナログに関して特有である。

プロフィールを50 ppbで実験的にも調べ、図2Bに示した。計算したパターンと実験で得たパターンは非常によく似ている。図2Bにグラフで示した結果を、下記の表3に数値で示した。

実験プロフィールを計算した対照プロフィールにマッチングさせることで、未知試料の確認ができる。従って、計算プロフィールのカタログ的集合は、この様に未知試料の確認のための対照を提供する。

(以下余白)

表3
7種のS-トリアジン類(50 ppb)に対する5個のS-トリアジン類の免疫-交差反応プロファイル

細胞株*	IC50 (ppb)**						
	7159' 7	739' 7	7'08' 7	7'09' 7	7'10' 7	7'11' 7	7'12' 7
AMG5.1	100.2bE	555.0	884.0	598.0	9100.0	3020.0	1780.0
AMBS.1	140.1	16.5	113.0	6.7	18.4	3.2	1.6
AMOL.2	160.1	21.6	58.5	7.7	110.0	42.8	31.4
AMB.1	160.2bE	16.1	35.7	5.4	114.0	13.0	14.6
SAMA.1	160.1.E	76.0	82.1	60.0	2100.0	610.0	1190.0

* 各クローンの最初の1つのは、免疫したハブテンがアトランジン・メルカプトプロパン酸(MH)複合体、あるいはシマジニアミノヘキサン酸(SI)複合体であることを示している。

** IC50は複合E/Sを、最大値の1/1000倍する濃度トリアジンの濃度である。試験はバーネークを適合させた曲線から得た。ppb = 1 ng/(10億個あたり) = 1 ng/L。

組成/反応性プロットの決定

実施例2の図2Aに示した様なプロフィールを、10-1000 ppbの範囲の一連の濃度の7種のトリアジン全てにに関して調べた。各濃度での各トリアジンに対する5種の抗体に関する阻害百分率の値は、5次元空間中の座標を与える。従って、各濃度での各アノログは、5次元空間中でのプロフィールを表す唯一の点を与える。

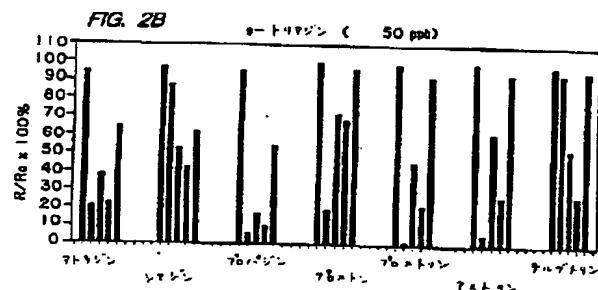
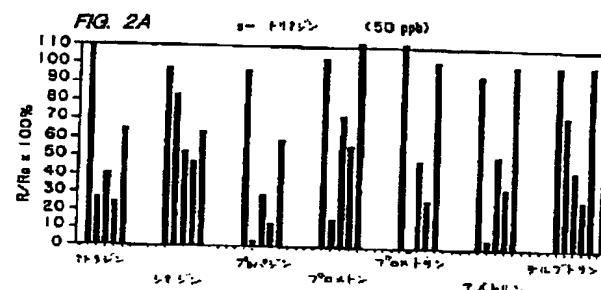
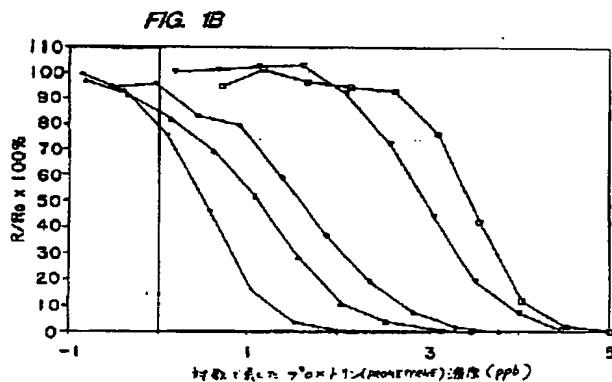
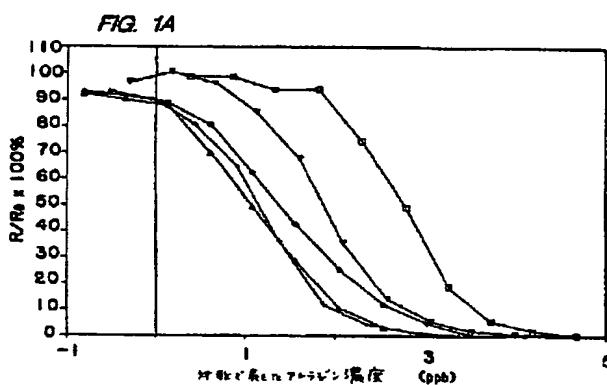
得られたパターンは、抗体のパネルに関して、種々の濃度での個々の被分析物により表される固有の一連の点を示している。

これらのデータをよりよく視覚化するために、この5次元プロットを、図3に示す様に1次元のアレーに投影した。

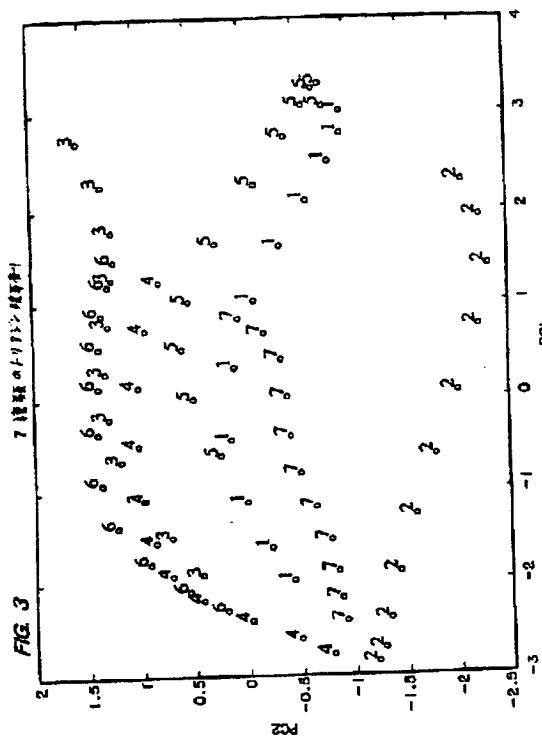
この投影用いた2次元の平面の配向は、データの分散を最もよく保持する配向、即ち投影された線がよく分離されている時に、投影図で、互いに他の頂の上に位置する点が最も少なくなる配向である。この配向は、データの一次成分により特定される平面として数学的に定義される。一次成分により定義されたこの平面上の投影点は、Massart, D.L.ら、"Chemometrics: A Textbook" (1988), Elsevier, New Yorkに記載されている様に、元のデータの集合状態(clustering)と特性を保持している。

図3に示した様に、「1」のラベルをつけた点は全て種々の濃度のアトラジンを、「2」のラベルを付けた点は全て種々の濃度のシマジンを示す、等である。

この実施例で既知の組成に関して記載したのと同様の様式で、試料のプロフィールを得ることから、点の位置を調べることで、その試料の被分析物組成が得られる。



BEST AVAILABLE COPY



International application No.		
PCT/US84/02716		
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC6: G01N 21/065, 21/066, 21/227, 21/231, C12Q 1/00 U.S. CL. 434/312, 581, 517, 435/1		
2. FIELDS SEARCHED		
None. No correspondence between classification system followed by classification symbols.		
U.S. 434/312, 581, 517, 435/1		
Description of search and main classes or categories or field of classification of documents searched or examined		
None. No correspondence between classification system followed by classification symbols.		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim(s)
A	W. CLARK, "THE EXPERIMENTAL FOUNDATIONS OF MODERN IMMUNOLOGY", published 1980 by John Wiley and Sons (N.Y.), vol. pages 81-92, especially pages 81-85.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Sec. C. <input type="checkbox"/> Two prior, family patent.		
<p>4. Detailed statement of relevant information</p> <p>(a) concerning the present state of the art which is considered to be of particular significance for the examination</p> <p>(b) concerning the content of the patent specification which is considered to be of particular significance for the examination</p> <p>(c) concerning the content of the patent application which is considered to be of particular significance for the examination</p> <p>(d) concerning the content of any document, esp. evidence or other material, referred to in the patent specification, esp. evidence or other material, referred to in the patent application, esp. evidence or other material, referred to in the present application</p> <p>(e) concerning the prior art concerning which the present application is concerned</p> <p>(f) concerning the present application</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 July 1984		24 JUL 1984
Name and address of the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks Washington, D.C. 20231		Patentee's attorney
Telephone No. NOT APPLICABLE		Fax No. (703) 358-2796